

# 草麻黄水提物对大鼠蛛网膜下腔出血后继发性脑损伤的影响

唐政恒,高诗豪,陈图南,李飞,陈冬艺,单佑安,冯华,程远<sup>△</sup>

(重庆医科大学附属第二医院神经外科 400038)

**[摘要]** **目的** 观察草麻黄水提物对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后继发性脑损伤的治疗作用并探讨其部分机制。**方法** SD大鼠50只,分为模型组、对照组和3个不同浓度(4、12、36 mg/kg 草麻黄水提物)治疗组,术后3 d,各组动物脑含水量及脑组织匀浆检测丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)与羟自由基等的变化;HE染色观测各组动物SAH与水肿情况;免疫组织化学及Western blot法检测各组动物脑组织补体C3的表达变化。**结果** 术后3 d,同模型组相比,12、36 mg/kg治疗组脑组织MDA水平、GSH-Px酶活力、羟自由基能力显著降低( $P < 0.01$ ),4 mg/kg治疗组的MDA水平变化不明显( $P > 0.05$ ),但GSH-Px酶活力与抑制羟自由基能力显著降低( $P < 0.01$ ),同时,12、36 mg/kg治疗组脑组织含水量较模型组明显降低;Western blot与免疫组织化学显示36 mg/kg治疗组补体C3的表达较模型组明显降低。**结论** 草麻黄水提物能降低脑水肿的严重程度,从而减轻炎症反应,对SAH动物具有较好的治疗效。

**[关键词]** 蛛网膜下腔出血;补体C3;草麻黄水提物;大鼠

**[中图分类号]** R743.35

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)25-3481-04

## The influence of the aqueous extract of ephedra sinica treating in brain damage after subarachnoid hemorrhage in rats

Tang Zhengheng, Gao Shihao, Chen Tunan, Li Fei, Chen Dongyi, Shan Youan, Feng Hua, Cheng Yuan<sup>△</sup>

(Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the therapeutic effect and mechanism of the aqueous extract of ephedra sinica on brain damage after subarachnoid hemorrhage(SAH) in rats. **Methods** Totally 50 rats of Sprague-Dawley were randomly divided into control group, model group and three groups treated with different concentrations(4, 12, 36 mg/kg). The changes of the cerebral water content, malondialdehyde(MDA), glutathione peroxidase(GSH-Px) and hydroxy radical of brain tissue were recorded, and hematoxylin-eosin(HE) staining was used to test the subarachnoid haemorrhage and oedema, and immunohistochemistry and western blot were carried out to assay the expression of complement C3 in brains of different animal in different group 3d after operation. **Results** On the postoperative 3 days, compared with the model group, the content of MDA, GSH-Px activity and hydroxyl radical of 12, 36 mg/kg treatment groups significantly reduced( $P < 0.01$ ), the content of MDA of 4 mg/kg treatment group not change( $P > 0.05$ ), but GSH-Px activity and inhibition of hydroxyl radical significantly reduced( $P < 0.01$ ), and the cerebral water content of 12, 36 mg/kg groups were obviously lower compared with model group. The expression of complement C3 was significantly lower on 36 mg/kg treatment group and edema reduced. **Conclusion** The aqueous extract of ephedra could significantly inhibit the activity of complement C3, prevent the production of MDA, GSH-Px and hydroxyl radical, reduce the severity of cerebral edema and the inflammatory response, which has a better therapeutic effect SAH animals.

**[Key words]** subarachnoid hemorrhage; complement C3; aqueous extract of ephedra sinica; rat

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是多病因致脑底或脑及脊髓表面血管破裂的急性出血性脑血管病,约占急性脑卒中的10.0%,占出血性脑卒中的20.0%。SAH常采取控制血压、减轻水肿及止血予以治疗,目前多选用以尼莫地平为代表的钙拮抗剂进行治疗,尼莫地平脂溶性强,能透过血-脑屏障,有效改善水肿周围脑血流量并减轻脑水肿,进而减轻对周围脑组织的压迫,减少神经细胞的损害<sup>[1-2]</sup>。近年研究显示,补体系统过度活化在SAH发病过程中也发挥了重要作用,但目前临床上尚缺乏有效的补体抑制性药物。

草麻黄在我国分布广,是中药方剂的常用药<sup>[3]</sup>,对急性肾炎、支气管哮喘、免疫炎症反应相关疾病等有较显著的疗效,有研究认为,抑制补体活化介导的炎症及免疫反应是草麻黄发挥治疗作用的根本机制<sup>[4]</sup>。补体激活成分C3a是一种重要的炎症介质,在感染、创伤、缺血再灌注损伤、自身免疫疾病等多种原因引起的急、慢性炎症反应中,介导了对自身组织细胞的病理损伤。而炎症及免疫反应,尤其补体活化介导的炎症及免

疫反应在中枢神经系统损伤中的预后起重要的作用<sup>[5]</sup>。因此,用补体抑制剂阻断补体活化可成为治疗炎症的一种有效手段,杨康等<sup>[6]</sup>证实草麻黄水提物中碱沉淀物在体外具有良好的补体抑制活性。故本研究采用草麻黄水提物灌胃SAH大鼠,观察其对SAH的治疗效果,为SAH治疗提供新方法。

### 1 材料与方法

**1.1 草麻黄水提物的制备** 草麻黄水提物制备主要参考Ling等<sup>[7]</sup>的方法进行。具体方法:1 kg草麻黄加入10 L蒸馏水(pH 4.0),60℃过夜后煮沸1 h,过滤除渣,NaOH调其pH值至9.0并出现大量沉淀,离心弃上清液,无水乙醇洗涤沉淀3次,60℃烘干得棕褐色粗品18.500 g。将粗品溶于300 mL蒸馏水(pH 4.0),磁力搅拌1 h,离心弃沉淀,再用NaOH调其pH值至9.0,离心弃上清液。上述酸溶碱沉过程重复3次,最后得水提物2.375 g,得率为12.8%(粗品计算),使用前将碱沉淀物溶于蒸馏水中,调pH值至4.0。

**1.2 动物分组与SAH模型制备** SPF级SD大鼠50只,体

质量 200.00~250.00 g, 2~3 个月龄, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供, 雌雄各半, 随机数字表法随机分为模型组、对照组和 3 个不同浓度(4、12、36 mg/kg 的草麻黄水提物)治疗组, 每组 10 只。以一尼龙线( $\Phi 0.235$  mm)自颈外动脉导入, 经颈总动脉达颈内动脉颅内段穿刺其分叉处, 以此建立 SAH 模型。手术显微镜下, 将一尼龙线( $\Phi 0.235$  mm)自颈外动脉导入, 经颈总动脉达颈内动脉颅内段穿刺其分叉处, 以此建立大鼠 SAH 模型<sup>[8]</sup>, 并可通过局部脑血流量监测判断模型是否成功<sup>[9]</sup>。建模 12 h 后, 治疗组以 4、12、36 mg/kg 的草麻黄水提物分别灌胃, 对照组仅剥离各动脉管作假手术对照, 对照组及模型组仅以等量生理盐水灌胃治疗。随时观察各组动物的活动、进食、大小便等状况。

**1.3 检测指标** 3 d 后断头处死各组实验大鼠, 解剖大鼠脑组织, 大体观察其损伤、出血等情况。采用干湿法检测脑组织含水量, 并制作 10.0% 组织匀浆, 离心取上清液进行谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、羟自由基等检测, 严格按试剂盒操作说明书进行。HE 染色: 取海马组织, 制成常规病理石蜡切片, HE 染色, 光学显微镜下观察各组病变情况。免疫组织化学观察: 用抗补体 C3 鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruze, sc-28294, 1:200)配合即用型检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, SP-9002)对补体 C3 抗原染色, DAB 显色并拍照。提取总蛋白: 取大鼠海马组织, 剪碎后加 RIPA 裂解液(碧云天, P0013B)。冰浴中匀浆, 离心取上清液, 测蛋白浓度后分装, 置 -80 °C 保存备用。蛋白水平测定按 BSA 法,

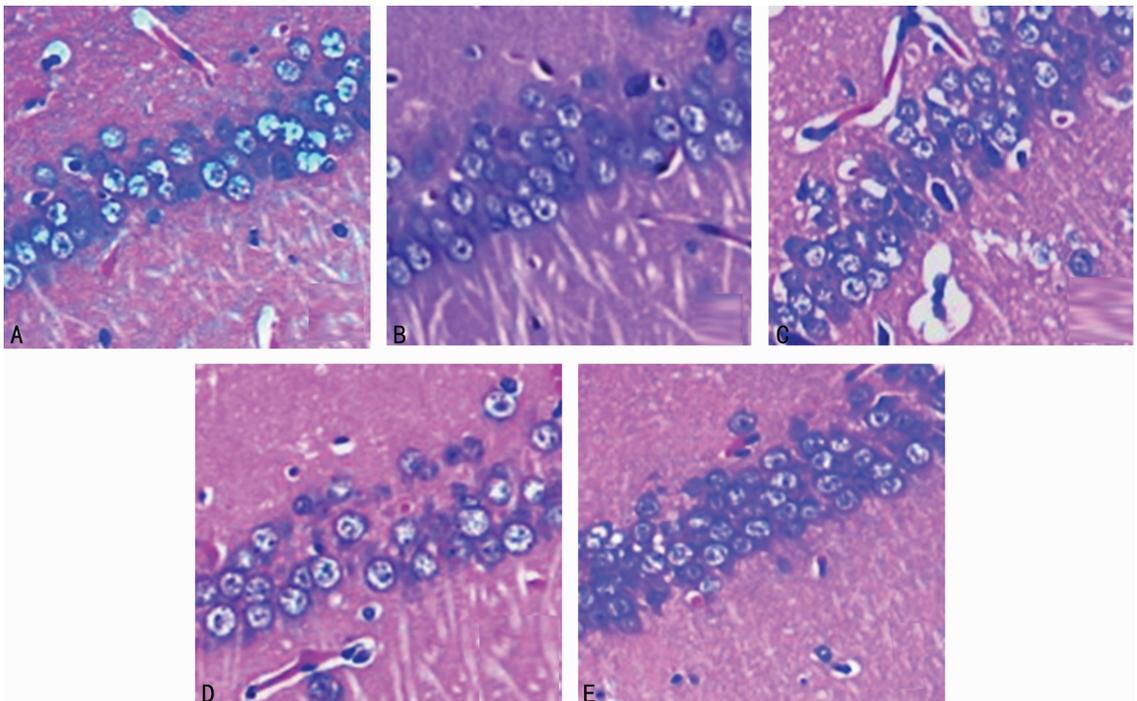
以牛血清清蛋白为标准蛋白。Western blot 检测: 50  $\mu$ g/孔蛋白样品经 6.0% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 13 V(恒压)过夜, 将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜以含 5.0% 脱脂奶粉的 TBST(100 mmol Tris, 0.9% NaCl, pH 7.5)室温封闭 2 h, 抗补体 C3 鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruze, sc-28294, 1:200)室温反应 2 h, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:1 000 倍稀释)室温反应 2 h。化学发光法显色并拍照。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 术后大鼠一般情况和大体观察** 术后正常饲养, 除对照组外, 其余各组大鼠均出现进食减少, 精神萎靡, 活动缓慢及个别鼠大小便失禁等。术后 3 d 内, 除 36 mg/kg 治疗组与对照组大鼠无死亡外, 其余各组均死亡 1 只。除对照组外, 其余各组均见明显 SAH, 大量弥散性出血及血凝块, 主要分布于前、后颅窝处, 包绕脑底部血管, 穿刺侧出血量相对较多。

**2.2 脑组织含水量** 脑组织观察可见 SAH 损伤脑组织较对照组明显水肿, 体积增大, 模型组脑含水量显著高于对照组( $P < 0.01$ ); 草麻黄水提物 12 mg/kg 及 36 mg/kg 治疗组脑组织含水量较模型组有明显降低( $P < 0.05$ ), 4 mg/kg 治疗组与模型组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 且脑含水量随着用药剂量增加呈下降趋势。见表 1。



A: 4 mg/kg 治疗组; B: 12 mg/kg 治疗组; C: 36 mg/kg 治疗组; D: 模型组; E: 对照组。

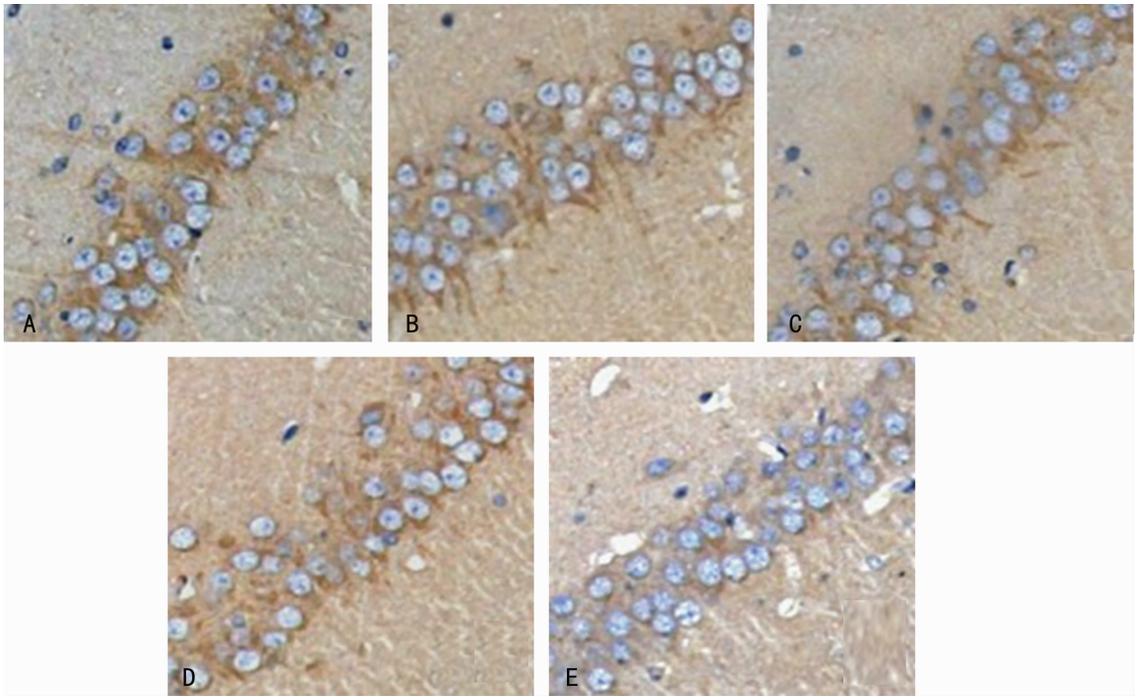
图 1 草麻黄水提物治疗 SAH 的病理观察( $\times 100$ )

**2.3 生化指标检测** SAH 后 3 d, 各组实验大鼠脑组织匀浆生化指标检测结果显示, 与模型组比较, 对照组显著降低( $P < 0.01$ ), 草麻黄水提物 12、36 mg/kg 治疗组 MDA 水平、GSH-Px 酶活力与羟自由基能力显著降低( $P < 0.01$ ); 草麻黄水提物 4 mg/kg 治疗组的 MDA 水平变化不明显, GSH-Px 酶活力与抑制羟自由基能力显著降低( $P < 0.05$ ), 见表 2。

**2.4 HE 染色观察病理情况** 术后 3 d HE 染色显示, 模型组脑组织海马 CA1 区呈现明显充血、水肿, 部分细胞肿胀、皱缩, 细胞周间隙增大。对照组海马 CA1 区神经元排列整齐, 结构完整, 核仁及尼氏体清楚。而草麻黄水提物治疗后, 充血与水肿均有不同程度的缓解(图 1), 且随药物剂量的增加其充血、水肿改善越明显。

**2.5 免疫组织化学检测补体 C3 表达情况** 免疫组织化学结果表明,各组大鼠脑组织海马 CA1 区均见补体 C3 表达,其中对照组表达很弱,SAH 模型组的表达最强,草麻黄水提取物治疗

组 C3 表达较模型组均有降低,提示草麻黄水提取物对补体活化具明显抑制作用。见图 2。



A: 4 mg/kg 治疗组; B: 12 mg/kg 治疗组; C: 36 mg/kg 治疗组; D: 模型组; E: 对照组。

图 2 免疫组织化学检测草麻黄水提取物治疗 SAH 后补体 C3 表达情况 (×100)

表 1 各组大鼠脑组织含水量的比较 (x̄±s)

组别	n	脑组织含水量 (%)
对照组	5	76.58±0.72 <sup>a</sup>
模型组	5	83.25±0.34
4 mg/kg 治疗组	5	82.76±1.02
12 mg/kg 治疗组	5	80.01±1.25 <sup>b</sup>
36 mg/kg 治疗组	5	79.64±2.07 <sup>b</sup>

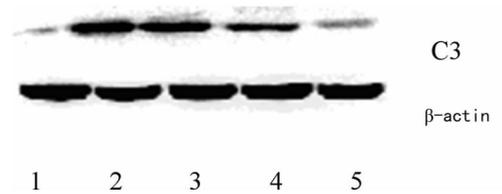
<sup>a</sup>: P>0.05, <sup>b</sup>: P>0.01, 与模型组比较。

表 2 各组大鼠脑组织生化指标检测 (x̄±s)

组别	n	MDA (mmol/L)	GSH-Px (U/ml)	羟自由基能力 (U/ml)
对照组	5	5.44±1.95 <sup>a</sup>	194.52±2.76 <sup>a</sup>	10.82±4.25 <sup>a</sup>
模型组	5	32.30±1.72	559.74±7.39	83.02±1.09
4 mg/kg 治疗组	5	28.10±9.94	408.46±6.22 <sup>b</sup>	48.54±2.31 <sup>b</sup>
12 mg/kg 治疗组	5	15.71±5.81 <sup>a</sup>	398.78±11.20 <sup>a</sup>	21.35±11.49 <sup>a</sup>
36 mg/kg 治疗组	5	11.10±3.09 <sup>a</sup>	297.01±1.65 <sup>a</sup>	20.25±10.82 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: P<0.01, <sup>b</sup>: P<0.05, 与模型组比较。

**2.6 Western blot 法检测补体 C3 表达情况** 术后 3 d Western blot 检测结果表明,各组大鼠脑组织海马 CA1 区均有补体 C3 表达,其中对照组表达最弱,模型组表达最强,治疗组居中,且 36 mg/kg 治疗组与模型组相比明显降低,4 mg/kg 与 12 mg/kg 治疗组与模型组相比变化不明显,进一步证实了草麻黄水提取物对补体活化具有明显抑制作用。见图 3。



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 4 mg/kg 治疗组; 4: 12 mg/kg 治疗组; 5: 36 mg/kg 治疗组。

图 3 Western blot 检测草麻黄水提取物治疗 SAH 后补体 C3 表达情况

### 3 讨论

Ling 等<sup>[7]</sup>从草麻黄中纯化出一种单体成分(CIC),并初步鉴定为高分子碳水化合物,不溶于碱溶于酸,证实该成分在体外具有良好的补体抑制活性。Ling 等<sup>[7]</sup>在体外实验中提出,CIC 通过结合补体蛋白 C2 的活性部位,从而抑制补体活化的经典途径,且该结合是不可逆的;其次,CIC 抑制补体蛋白 C9 的活化,并抑制终末途径激活补体;但对替代途径激活补体的抑制机制尚不清楚,很有可能是通过抑制 B 因子的活性发挥作用。

中枢神经系统损伤是存在补体系统激活的必要条件。中枢神经系统损伤患者脑组织存在自由基代谢紊乱,细胞膜磷脂中多聚不饱和脂肪酸的不饱和双键受自由基的攻击,导致脂质过氧化反应,形成一系列的脂质自由基及其降解产物如 MDA 等。因此,大量氧自由基的产生及其诱导的脂质过氧化在中枢神经系统损伤的发病机制中起着重要作用<sup>[8-10]</sup>。GSH 作为一种体内自由基清除剂与 GSH-Px 结合,参与自由基和脂质过氧化物损伤的防护,在脑损伤抗氧化防御中发挥作用<sup>[11-12]</sup>。本研究生化指标检测结果说明,经草麻黄水提取物治疗后,与模型

组相比,治疗组脑组织中 MDA、GSH-Px 与羟自由基水平均显著降低。提示草麻黄水提物在 SAH 的抗脂质过氧化损伤中可能起重要作用。

补体系统的重要固有成分 C3,是补体活化后的主要片段,处于 3 个途径的汇合点,在补体系统激活过程中起着枢纽作用<sup>[13]</sup>。本研究将草麻黄水提物用于治疗大鼠 SAH,免疫组织化学与 Western blot 结果显示,在对照组、草麻黄水提物治疗组及模型组的脑组织中均有重要补体固有成分 C3 的表达,但对照组中表达很弱,且草麻黄水提物治疗组的 C3 表达明显低于模型组,提示草麻黄水提物可能抑制补体系统的激活。常规病理观察及脑组织含水量显示,草麻黄水提物治疗后,SAH 与水肿均得到不同程度的缓解,且从切片上可以观察到出血与水肿随剂量的增加改善越明显。

综上所述,草麻黄水提物能显著抑制补体 C3 活性,阻止脑组织 MDA、GSH-Px、羟自由基的产生,降低脑水肿的严重程度,从而减轻炎症反应,对 SAH 动物具有较好的治疗效应。

#### 参考文献

- [1] 程景丽,和姬苓,耿红,等.大鼠脑缺血再灌注损伤后尼莫地平对神经细胞凋亡影响的研究[J].中国现代医生,2010,48(6):1-2.
- [2] 林昭敏,吴静,王梅平.尼莫地平用于治疗血管性痴呆的疗效观察[J].海峡药学,2009,21(10):101-103.
- [3] 李佳莲,方磊,张永清,等.麻黄的化学成分和药理活性的研究进展[J].中国现代中药,2012,14(7):21-27.
- [4] Liu Y, Luo J, He F. Experimental study on anti-inflammatory effects of mahuang decoction and its compositions [J]. Zhong Yao Cai, 2005, 28(5): 413-415.
- [5] Nguyen HX, Galvan MD, Anderson AJ. Characterization of early and terminal complement proteins associated with polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo after spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation, 2008, 5(3): 26.
- [6] 杨康,刘维永,白云.草麻黄中补体抑制成分的纯化和活性[J].第四军医大学学报,2000,21(12):1558-1560.
- [7] Ling M, Piddlesden SJ, Morgan BP. A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in the classical and alternative pathways of complement [J]. Clin Exp Immunol, 1995, 102(3): 582-588.
- [8] 金清东,陈志,刘智,等.一种非开颅大鼠蛛网膜下腔出血动物模型的建立[J].牡丹江医学院学报,2008,29(6): 5-8.
- [9] 金清东,林秋泉,陈志,等. EEG 和 rCBF 监测在大鼠非开颅 SAH 模型中的应用[J].第三军医大学学报,2007,29(13):1282-1284.
- [10] Nita DA, Nita V, Spulber S, et al. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion—a biochemical study in rat [J]. J Cell Mol Med, 2002, 5(2): 163-170.
- [11] Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death [J]. Brain Res Brain Res Rev, 1997, 25(3): 335-358.
- [12] 邓暑芳,李素云,贺性鹏.甲基叔丁基醚对胎鼠脑组织 MDA、SOD 及 GSH 的影响[J].南华大学学报:医学版,2007,35(1):7-9.
- [13] Swarup V, Ghosh J, Das S, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain mediated neuronal death contributes to the glial activation and subsequent neuroinflammation in Japanese encephalitis [J]. Neurochem Int, 2008, 52(7): 1310-1321.

(收稿日期:2015-03-08 修回日期:2015-06-01)

## 《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 资料的表达与描述:用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料,用 M(QR) 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。
4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等),统计量的具体质(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$  等);在用不等式表示  $P$  值的情况下,一般情况下选用  $P>0.05, P<0.05$  和  $P<0.01$  3 种表达方式,无须再细分为  $P<0.001$  或  $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间(CI)。